

NP-49-NP

(AD)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. April 2003 (17.04.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/031470 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/44**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/03799

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Oktober 2002 (02.10.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 48 732.0 2. Oktober 2001 (02.10.2001) DE
101 56 679.4 12. November 2001 (12.11.2001) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS- UND VERTRIEBS GMBH [DE/DE]; 30, Fabeckstrasse, 14195 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): FUERTES, Laura, López [ES/ES]; 72, 3º dcha, Alonso Cano, 28003 Madrid (ES). JIMÉNEZ, Marcos, Timón [ES/ES]; 34, 2K Santa Clara, 28200 San Lorenzo de El Escorial (ES).

(74) Anwalt: BOECKH, Tobias; HERTIN Anwaltssozietät, 54/55, Kurfürstendamm, 10707 Berlin (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/031470 A2

(54) Title: DNA-EXPRESSION CONSTRUCT FOR TREATMENT OF INFECTIONS WITH LEISHMANIASIS

(54) Bezeichnung: DNA-EXPRESSIÖNSKONSTRUKT ZUR BEHANDLUNG VON INFektIONEN MIT LEISHMANIOSE

(57) Abstract: The invention relates to a DNA-expression construct for treatment of infections with leishmaniasis and a corresponding vaccine. The above serves for immunization against leishmaniasis, whereby the immunogene p36/LACK antigen is used to generate an immunoresponse. A linear double-stranded covalently closed expression cassette is used as gene transport. According to the invention, the gene expression construct can be covalently bonded to an oligopeptide to increase the transfection efficiency.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein DNA-Expressionskonstrukt zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionen, sowie eine entsprechende Vakzine. Diese dient zur Immunisierung gegen Leishmaniose, wobei insbesondere das immunogene p36 LACK Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort benutzt wird. Als Genfähre wird eine linear-doppelsträngige kovalent geschlossene Expressionskassette verwendet. Das Genexpressionskonstrukt kann zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist.

**DNA-Expressionskonstrukt zur Behandlung von
Infektionen mit Leishmaniose**

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein DNA-Expressionskonstrukt zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionen, sowie eine entsprechende Vakzine.

Leishmanien sind trypanosomatide Flagellaten aus der Ordnung Kinetoplastida, die durch weibliche blutsaugende Sandmücken der Gattung Phlebotomus und Lutzomy-

5 ia auf verschiedene Säugetierspezies und auf den Menschen übertragen werden.
Leishmaniosen sind Erkrankungen mit verschiedenen klinischen Krankheitsbildern, die ein bedeutendes Gesundheitsproblem darstellen. Die WHO schätzt, dass weltweit ca. 12 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen sind. Ca. 2 bis 9% aller
HIV-Patienten erkranken an viceraler Leishmaniose, damit ist dies die dritt häufigste
10 parasitäre Krankheit, an der HIV-positive Personen erkranken.

Chemotherapie als Behandlungsmethode zeigt nur einen geringen Effekt.

Da Personen, die die Infektion überstanden haben, eine starke Immunität gegen eine spätere Infektion entwickeln, sollte die Entwicklung eines wirksamen Impfschutzes möglich sein.

15 Das Prinzip der Immunisierung beruht auf der Wiedererkennung von Strukturen bereits erfolgreich bekämpfter Erreger. Zwei Hauptarme der Immunabwehr können dabei unterschieden werden: der humorale, welcher auf der Synthese von Antikörpern beruht, die in der Lage sind, im extrazellulären Raum befindliche Bakterien zu bekämpfen und der zelluläre, der im Wesentlichen auf der Aktivität von T-
20 Lymphozyten des Immunsystems beruht. T-Lymphozyten sind in der Lage, mit Viren infizierte Zellen zu erkennen. Die humorale Immunabwehr wird auch als Th2 pathway und die zelluläre Immunabwehr als Th1 pathway bezeichnet. Die Impfung bzw. Immuntherapie von Leishmaniose, deren Ursache intrazelluläre Parasiten sind, sollte durch die Erzeugung einer Th1-typischen Immunreaktion möglich sein. Im

Stand der Technik wird vielfach auf die Bedeutung der Erzeugung einer Th1 Antwort in der Therapie oder Prävention von Leishmaniose hingewiesen. (Handman et al., J Immunol 160: 3949-57, Gurunathan et al., Nature Med: 4(12): 1409-15). Zur Förderung der Auslösung einer Th1-typischen Immunantwort wird auf das kostimulatorische Zytokin IL-12 als unerlässliches Adjuvant verwiesen (Parker et al., J. Immunol. 140: 896-902).

Verschiedene Antigene wurden in experimentellen Impfprotokollen in Mäusen getestet. BALB/c Mäuse sind ein gutes Modell zum Studium der Leishmaniose. Es bestehen im Infektionsverlauf und der Läsionsentwicklung sehr große Ähnlichkeiten zum Menschen. Die immunologische Reaktion in Mäusen auf diese Infektion, scheint der im Menschen und wahrscheinlich auch der in Hunden zu gleichen (Cox, Int. J. Parasitol. 263: 1147-1157). Verwendete Antigene waren das gp 63 (Scott et al., J. Exp Med. 168: 1675-1684), gp 46 (McMahon-Pratt et al., Infection and Immunity 61: 3351-3359), p-4 und p-8 (Scott et al., Immunology 99: 615-624) sowie das p36 oder auch als LACK bezeichnete Antigen (Gonzales-Aseguinolaza et al., Eur. J. Biochem. 259: 909-916). LACK ist ein 36 kDa Antigen von Leishmanien, das hochkonserviert ist und in allen verwandten Leishmaniaarten zu finden ist. Exprimiert wird es sowohl in der parasitären Promastigote und Amastigote, den beiden Stadien des parasitären Zyklus im Wirt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß die Induktion einer zytotoxischen Th1, auf Interferon-gamma und IL-12 Sekretion durch T-Helferzellen, Immunantwort die Überwindung einer Testinfektion fördert, während die Induktion einer IL-4 getriebenen Th2 Helferzellantwort die Infektion begünstigt. Um die Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th1 zu fördern, setzten Gonzalo et al. Vaccinia Virus als virale Gefähre und IL-12 als Adjuvant ein. Als Immunogen wurde p36/LACK Antigen benutzt. Verschiedene Impfregime wurden zusammengestellt. Das erfolgreichste Impfregime, Erstimmunisation mit p36 Protein, Zweitimmunisation mit rekombiantem Vaccinia Virus, kodierend für p36 und IL-12, führte zu einer durchschnittlichen Verkleinerung der Läsionen um 52% im Vergleich zu ungeimpften Mäusen. Den größten Infektionsschutz wiesen die Tiere auf, die den höchsten IgG2a Antikörpertiter hatten (Gonzalo et al., Microbes and Infection: 3 (9): 701-711).

- 3 -

Zum Einschleusen der die immunogenen Antigene oder Teile davon kodierenden DNA sind verschiedene chemische, physikalische und biologische Transfektionsmethoden bekannt.

Biologische Mittel zur Transfektion, sog. Genfären, sind virale Vektoren, Plasmide
5 oder kovalent geschlossene minimalistische DNA-Konstrukte, die im folgenden MIDGE genannt werden (MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTORS, vgl. EP 0 914 318 B1).

Plasmide werden durch bakterielle Fermentation gewonnen. Sie enthalten neben dem gewünschten Gen auch die für ihre Vervielfältigung und Selektion notwendige
10 DNA, üblicherweise Resistenzgene gegen bei der Fermentation verwendete Antibiotika. Diese bakterielle DNA hat den Nachteil, dass sie immunstimulatorische Sequenzen ("ISS", z.B. nicht-methylierte Cytosin-Guanin Dinukleotide, „CpG“) enthalten kann. Bei Immunsuppression ist genau diese Wirkung nicht erwünscht (ausführlich beschrieben in DE 199 35 756). Bei der Verwendung von Genexpressionskonstrukten auf Basis von Plasmid-DNA besteht zudem das inhärente Risiko der
15 Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen, welches insbesondere bei Schutzimpfungskampagnen nicht vertretbar ist. Aus diesem Grund ist auch die von Gurunathan et al. (J. Exp. Med., Vol 186, No. 7, (1997): 1137-1147) vorgeschlagene Methode der Vakzinierung mit eukaryotischen Expressionsvektoren, die das Leishmania-spezifische p36 LACK-Antigen enthalten, äußerst nachteilig. In der medizinischen Praxis stehen die beschriebenen Nachteile plasmidbasierter Expressionsvektoren ihrer breiten Anwendung massiv entgegen.

Die auf Grund ihrer hohen Transfektionseffizienz am häufigsten eingesetzten Genfären sind virale Vektoren. Jedoch stehen die mit deren Einsatz verbundenen Sicherheitsrisiken einer breiten Anwendung in erheblichem Maße entgegen. Es ist bekannt, dass ein hohes Risiko einer zytotoxischen Reaktion des Wirtsorganismus auf die transfigurierten Zellen besteht. So führte die Anwendung einer hohen Dosis eines Adenovirus bei einem klinischen Versuch zum Tod des Patienten; offensichtlich war die Ursache dafür eine starke Überreaktion des Immunsystems (Lehrman,
30 1999, Nature 401: 517-518). Weiterhin ist durch Instabilität des attenuierten Impfstammes die Rückverwandlung in einen virulenten Stamm nicht auszuschließen.

- 4 -

Außerdem können die viralen Bestandteile selbst immunogen wirken, was zu einer Herabsetzung ihrer Wirksamkeit durch das Immunsystems des Patienten führt.

Neben diesen Nachteilen, die durch die bisherigen Gentransfermethoden bedingt sind, ist es bisher trotz aller Bemühungen noch nicht gelungen, einen effektiven und

5 sicheren Impfschutz gegen Leishmaniose zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Mittel zur Verfügung zu stellen, welches ein sicheres, effektives und schützendes Impfen gegen Leishmaniose ermöglicht.

Die Aufgabe wird durch die Merkmale der unabhängigen Ansprüche gelöst.

Die Erfindung basiert auf der Zurverfügungstellung eines DNA-Expressionskonstrukts zur Immunisierung von Leishmaniose-Infektionen, wobei die immunisierenden Polynukleotidsequenzen als Expressionskonstrukte vorliegen, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schlaufen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promoters und einer Terminatorsequenz besteht und zur Verstärkung der Transfektionseffizienz mit einem oder mehreren Peptiden gekoppelt ist (vgl. EP 0 941 318 B1). Ein derartiges DNA-Expressionskonstrukt zeigt überaus überraschende Wirkungen (siehe unten), die mit anderen Methoden (zitierte Impfprotokolle) nicht zu erreichen sind; insbesondere treten auch die oben beschriebenen Nachteile von eukaryotischen Expressionsvektoren bei der Vakzinierung nicht auf.

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass das immunogene p36 LACK Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort verwendet wird. Als Genfähre wird eine linear-doppelsträngige kovalent geschlossene Expressionskassette verwendet. Diese besteht aus der kodierenden Sequenz, dem Promotor und gegebenenfalls Terminationssequenzen, so dass das Konstrukt nur die für die Expression des gewünschten Gens notwendige Information enthält (vgl. EP 0 941 318 B1) Ferner ist erfindungsgemäß vorgesehen, dass das DNA-Expressionskonstrukt zur Steigerung

- 5 -

der Transfektionseffizienz mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist, welches vorzugsweise eine Länge von fünf bis 25 Aminosäuren hat und mindestens die Hälfte der Aminosäuren zu der Gruppe Lysin oder Arginin gehören. Besonders bevorzugt ist eine Kernlokalisationssequenz, insbesondere

5 • Die ein Kern-Lokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal = NLS) darstellende Peptidsequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin = Seq ID 3) aus dem Simian Virus SV-40. Speziell für das SV-40-NLS wurde gezeigt, dass Proteine bis zu 465 kDa zum Zellkern gesteuert werden (Lanford et al. 1986, Cell 15; 46 (4): 575-82). Diese Fähigkeit des Peptids
10 wurde hier durch Kopplung an DNA für die Verbesserung des Gentransfers genutzt.

• oder das elf Aminosäuren lange T-Peptidfragment (YGRKKRRQRRR = Seq ID 2) des HIV-1 Genprodukts TAT.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten.
15 Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen und Figuren näher beschrieben und diskutiert.

Die überraschende Wirkung des erfindungsgemäßen DNA-Expressionskonstrukts und eines Arzneimittels, welches ein solches enthält, wird anhand der Darstellungen gem. der Figuren deutlich. Dabei bedeuten:

20	pMOK p36	Plasmid kodierend für p36 Antigen
	Mp36-NLS	MIDGE kodierend für p36 Antigen mit NLS Peptid gekoppelt
	pMOK ctr	Kontrollplasmid kodierend für HBsAg
	rVVp36	rekombinanter Vaccinia Virus kodierend für p36
	Phosphat	Phosphatpuffer als Kontrolle
25	Kontrolle +	Positivkontrolle, mit L. major infizierte Seren von Mäusen
	Kontrolle -	Negativkontrolle, Seren unbehandelter Mäuse

Es zeigt:

- 6 -

Fig. 1: die Bestimmung des Gesamt IgG Titer vor Belastungsinfektion mit Leishmania major Promastigoten. Nur die Impfregime, die eine Zweitimmunisierung mit rekombinantem Vaccinia Virus beinhalten, zeigen einen messbaren Antikörpertiter.

5 Fig. 2: Bestimmung des Gesamt IgG Titer nach Belastungsinfektion. Alle Impfprotokolle zeigen eine meßbare Antikörperantwort, wobei der höchste Titer an zirkulierenden Antikörpern von MIDGE p36-NLS / MIDGE p36-NLS ausgelöst wird.

10 Fig. 3: das Verhältnis der Antikörper-Isotypen IgG 2a und IgG 1 nach Zweitimmunisierung und Belastungsinfektion mit L. major Promastigoten. Überraschenderweise lösen die mit dem NLS-Peptid gekoppelten MIDGE eine nach der Antikörper-Isotypenverteilung zytotoxische Immunantwort (Th1) aus, die sich von der durch das Regime pMOKp36/rVVp36 ausgelösten nur gering unterscheidet.

15 Fig. 4: die Entwicklung der Läsionen in einem Zeitraum von 8 Wochen nach der Belastungsinfektion. Dabei bewirken die Impfprotokolle basierend auf MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS und pMOK p36/ rVV p36 den längsten Schutz gegen eine Infektion mit Leishmania major. Die Schutzwirkung wird durch eine deutlich verzögerte Läsionsentwicklung sichtbar. Der wirksamste und langanhaltende Schutz wird jedoch durch MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS erreicht.

20
25 Fig. 5: die Größe der Läsionen nach Woche 8. In der achten Woche nach der Belastungsinfektion ist die Läsionsgröße bei den mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS geimpften Tieren um 80% kleiner als bei der ungeimpften Kontrollgruppe. Es konnte sogar eine 11 prozentige Steigerung des Schutzes vor L. major im Vergleich mit der mit pMOK p36/rVV p36 geimpften Gruppe festgestellt werden.

Im einzelnen:

Es wurde untersucht, ob die Modifikation der minimalistischen Expressionskassetten mit Peptiden eine Änderung der Stärke oder Ausrichtung der Immunantwort zu erreichen vermag. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde versucht, verschiedene Peptide und andere organische Moleküle an die MIDGE kovalent zu koppeln.

- 5 So ist es gelungen durch kovalente Kopplung des Kernlokalisationssignals (NLS) aus dem SV 40 Virus an für HBsAg kodierende MIDGE, einen 10- bis 15-fach erhöhten Antikörpertiter nach intramuskulärer Applikation nachzuweisen (Schirmbeck et al., J. Mol Med. 2001 Jun.79 (5-6): 343-50).

In einem Impfversuch in Mäusen wurden verschiedene Genexpressionskonstrukte, 10 die für das Antigen p36 LACK kodierten, getestet. So wurden mit NLS Peptid gekoppelte MIDGE (MIDGE p36-NLS), Plasmid (pMOKp36) und rekombinanter Vaccinia Virus (rVVp36) eingesetzt. Um einen möglichst hohen Immunschutz zu erreichen, wurden verschiedene Impfregime formuliert. Als relevante Parameter für den klinischen Erfolg der Impfung wurde das Wachstum der infektionsbedingten Läsionen 15 in der infizierten Hinterpfote des Tieres gemessen. Als Surrogat-Parameter wurde das Verhältnis zwischen den IgG1 und IgG2a Antikörpersubtypen bestimmt. Allgemein lässt sich feststellen, daß ein zum IgG2a verschobenes Verhältnis der Subtypen mit Schutz vor Infektion bzw. eines deutlich verlangsamtem Wachstum 20 der Läsionen korreliert. Neben der aus dem Stand der Technik bekannten Methode der Erstimmunisierung mit Plasmid und der Zweitimmunisierung mit rekombinantem Vaccinia Virus (rVV), sollte getestet werden, ob ein ähnlicher Immunschutz auch mit 25 dem erfindungsgemäßen Arzneimittel erreicht werden kann.

Die Antikörpertiter für Gesamt IgG als Maß für die Auslösung einer Immunantwort wurden mittels ELISA bestimmt. Dabei konnten vor der Belastungsinfektion mit 25 Leishmania major Promastigoten nur durch zwei Impfregime messbare Antikörper erzeugt werden (s. Fig. 1). In beiden Fällen wurde rekombinanter Vaccinia Virus als Zweitimmunisation (Boost) verwendet. Verschiedene Studien beweisen, dass zirkulierende Antikörper allein noch nichts über eine vermeintliche Schutzwirkung aussagen. Ein Zusammenhang zwischen zirkulierenden Antikörpern und Schutz vor Infektion 30 kann erst nach der Belastungsinfektion gesehen werden. In Fig. 2 sind die Antikörpertiter nach der Belastungsinfektion mit L. major dargestellt. Alle Impfregime

zeigen messbare Antikörpertiter, wobei der höchste mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS erreicht werden konnte.

Die Antikörperisotypen IgG1 und IgG2a wurden bestimmt, um einen möglichen Th2/Th1 shift in der Immunantwort nachzuweisen. Die Isotopenverteilung von Immunglobin gamma (IgG) für ein bestimmtes Antigen spiegelt die Ausprägung der gesamten Immunantwort gegen dieses Antigen wider. Dabei sind IgG –1 Subtypen charakteristisch für eine humorale Antwort, begleitet von einer verstärkten Ausschüttung von Interleukinen IL-4 und IL-10 durch aktivierte Lymphozyten, ein erhöhter Spiegel von Subtyp IgG 2a ist typisch für eine zelluläre Th1-Antwort, begleitet von erhöhter Ausschüttung von IFN γ und IL-12. Das Auftreten der Isotypen ist dabei nicht exklusiv, die relativen Titer können jedoch als Indikator für die dominante Art der entstandenen Immunantwort gewertet werden.

Gemäß Fig. 3 sind mit dem NLS Peptid gekoppelte MIDGE Vektoren in der Lage, eine zelluläre (Th1) Immunantwort auszulösen. Wie dargestellt, ist der zelluläre Arm der Immunantwort entscheidend in der Bekämpfung intrazellulärer Parasiten. Die von MIDGE p36-NLS ausgelöste Verschiebung der Th2 in Richtung Th1 Antwort, unterscheidet sich nur gering von der durch pMOKp36/rVVp36 ausgelösten.

Zur Beurteilung der erreichten Schutzwirkung wurde eine Belastungsinfektion mit Leishmania major Promastigoten durchgeführt. Anhand des Größenwachstums der Läsionen in Abhängigkeit von der Zeit in Wochen wurde der Impferfolg bewertet. Dabei zeigte sich, dass die mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS behandelten Mäuse die vom Durchmesser kleinsten Läsionen aufwiesen, also MIDGE p36-NLS im Impfregime MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS den längsten Impfschutz bewirkt (s. Fig. 4 u. 5).

Diese Ergebnisse sind insofern sehr überraschend, da das erfindungsgemäße Arzneimittel in seiner Wirkung das derzeit im Stand der Technik als „bestes“ bezeichnete Impfregime der Zweitimmunisierung (Boost) mit rekombinantern Vaccinia Virus übertrifft, und die möglichen Nebenwirkungen, die von Plasmiden und attenuierten Viren ausgehen, vermeidet (Gonzalo et al., Microbes and Infection:3 (9) :701-711). Gleichzeitig ist das erfindungsgemäße Arzneimittel vergleichbar bis besser in seiner Schutzwirkung. Die Vermeidung von potentiellen Nebenwirkungen durch Plasmide

und rekombinannten Viren ist der entscheidende Vorteil des erfindungsgemäßen Arzneimittels, die Herstellung ist einfacher und kostensparender, zudem ist das erfindungsgemäße Mittel wesentlich sicherer.

Ausführungsbeispiele

5 Beispiel 1.1: Klonierung des Plasmids pMOKp36

Vom Ausgangsplasmid pSCp36 wurden 2 Fragmente mittels PCR amplifiziert:

1. PCR ca. 800 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 6),

Primer: rechts 5-TTATATGAGCTCAGAAGACACGGACAGGGACCTTCCGTCG
(= Seq ID 7)

2. PCR ca. 950 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 8),

Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTCTTACTCGGCCGTGGAGATGG (= Seq ID 9)

Das PCR-Produkt aus der 2. PCR wurde mit Eco31I geschnitten und das kleinere
15 Fragment (ca. 200 bp) isoliert.

Das PCR-Produkt aus der 1. PCR wurde mit BpI geschnitten.

Das 200 bp Fragment und das geschnittene Fragment aus der 1. PCR wurden ligiert und anschließend mit KpnI und SacI geschnitten und in den mit KpnI und SacI geschnittenen pMOK-Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt den Namen pMOKp36 (= Seq ID 1).

Beispiel 1.2: Kopplung der NLS Sequenz an Oligonukleotide

Die NLS Kopplung wurden wie folgt vorgenommen: das NLS Peptid mit der Sequenz PKKKRKV wurde in zwei Schritten an die ODN's gekoppelt. Zuerst wurde das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-dGGG AGT CCA GT xT TTC TGG AC (wobei

- 10 -

xT für aminomodifizierte Thyminbase mit C₂ – Amminolinker steht, = ODN 1 = Seq ID 4) (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipation (300mM NaOAc pH 5.2, 5 5.5 mM MgCl₂, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS gekoppelte ODN wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der 10 MIDGE p36-NLS Konstrukte verwendet.

Beispiel 1.3: Herstellung der MIDGE p36-NLS

MIDGE sind lineare, kovalent geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen (vgl. EP 0 941 318 B1). Die Konstrukte wurden 15 wie folgt erhalten: das unter Beispiel 1.1 beschriebene Plasmid pMOKp36 wurde mit Eco 31I vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotiden (ODN) 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC (= ODN 1 = Seq ID 4) und 5'-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC-3' (= ODN 2 = Seq ID 5) durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 31I wurde durch Erhitzen auf 70°C 20 gestoppt. Das resultierende Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 31I und T7 DNA Ligase in Abwesenheit von Deoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie.

Beispiel 1.4: p36 Antikörperbestimmung in Mäusen

MIDGE p36-NLS, pMOKp36 und rekombinanter Vaccinia Virus p36 (rVV) wurden in 25 weibliche (Balb/c) Mäuse nach folgendem Impfregime injiziert.

Tabelle 1

Gruppen	Erstimmunisierung (prime)	Zweitimmunisierung (boost)
1	pMOKp36	pMOKp36
2	MIDGE p36-NLS	MIDGE p36-NLS

- 11 -

3	pMOK Kontrolle	pMOK Kontrolle
4	pMOKp36	rVVp36
5	MIDGE p36-NLS	rVVp36
7	Phosphatpuffer	Phosphatpuffer

Je Gruppe wurden 10 Mäuse eingesetzt.

Die verwendeten DNA Mengen betrugen für:

pMOKp36: 100µg, i.d.

MIDGE p36-NLS: 54,8µg, i.d.

5 rVV p36: 5x10⁷ pfu/Maus, i.p.

und wurden in Natriumphosphatpuffer pH 7,2 gelöst, injiziert.

Nach 2 Wochen erfolgte die Zweitimmunisierung (boost) mit den entsprechenden (s. Tab. 1) DNA Konstrukten. Drei Wochen nach dem Boost erfolgte die Belastungsinfektion mit 5x10⁴ Leishmania major Promastigoten. Diese wurden den Mäusen in
10 die rechte Hinterpfote s.c. injiziert. Der Stand der Infektion wurde wöchentlich verfolgt. Die Größe der Läsionen wurde mit einer elektronischen Schiebelehre durch Vergleich mit der linken unbehandelten Hinterpfote bestimmt.

Acht Wochen nach der Belastungsinfektion wurden von allen Mäusen die Seren gewonnen. Der Gesamt-IgG Antikörpertiter gegen das p36 Antigen und die Bestimmung der IgG 2a und IgG 1 Antikörper erfolgte mittels ELISA, wobei die Absorption in OD (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 406$ nm bestimmt wurde.
15

Patentansprüche

1. DNA-Expressionskonstrukt zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass die immunisierenden Polynukleotidsequenzen als Expressionskonstrukte vorliegen, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche 5 einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schlaufen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu 10 impfenden Tier operablen Promoters und einer Terminatorsequenz besteht, wobei das DNA-Expressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem oder mehreren Oligopeptiden kovalent verknüpft ist.
2. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt ein oder mehrere Leishmania Antigene kodiert.
- 15 3. DNA-Expressionskonstrukt nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei das Expressionskonstrukt das p36 LACK Antigen kodiert.
4. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, wobei das Oligopeptid aus 3 bis 30 Aminosäuren besteht, von denen mindestens die Hälfte basische Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin kommen.
- 20 5. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 4, wobei das Oligopeptid die Aminosäuresequenz **PKKKRKV** (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) aufweist.
6. Verwendung des DNA-Expressionskonstruktes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Impfstoffes zur Behandlung von 25 Leishmaniose-Infektionskrankheiten.
7. Vakzine zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionskrankheiten, enthaltend das DNA-Expressionskonstrukt nach den Ansprüchen 1 bis 6.

Fig. 1 Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 LACK Antigen vor der Belastungsinfektion mit *L. major*

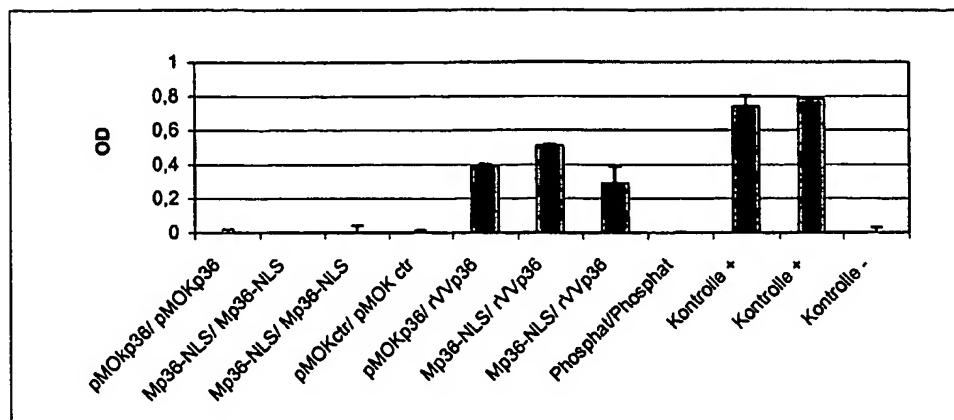


Fig. 2 Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 LACK Antigen nach der Belastungsinfektion mit *L. major*

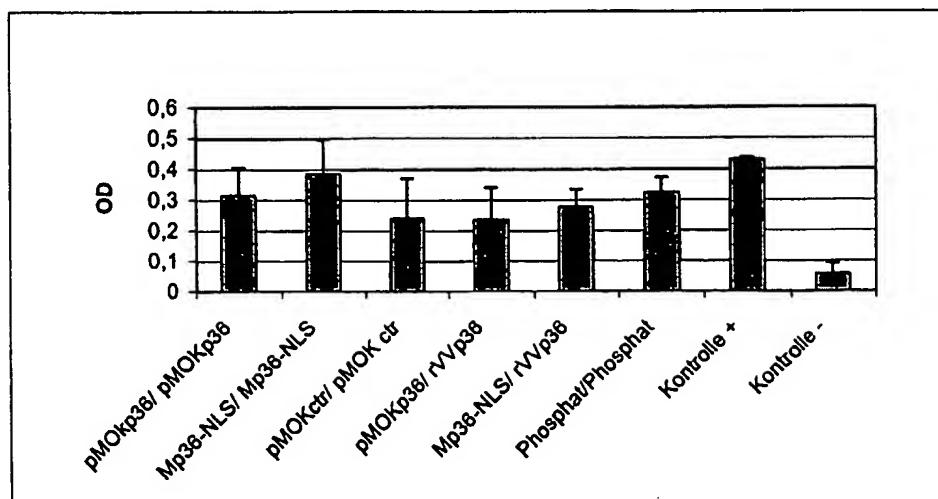


Fig. 3 Verhältnis der Isotypen IgG 2a/IgG 1 gegen p36 LACK Antigen

Impfregime	Isotypenverhältnis
pMOkp36/pMOKp36	0.9
Midge p36-NLS/Midge p36-NLS	1.3
pMOKctr/pMOKctr	1
pMOKp36/rVVp36	1.66
Midge p36-NLS/rVVp36	1.35
Phosphatpuffer/Phosphatpuffer	0.96

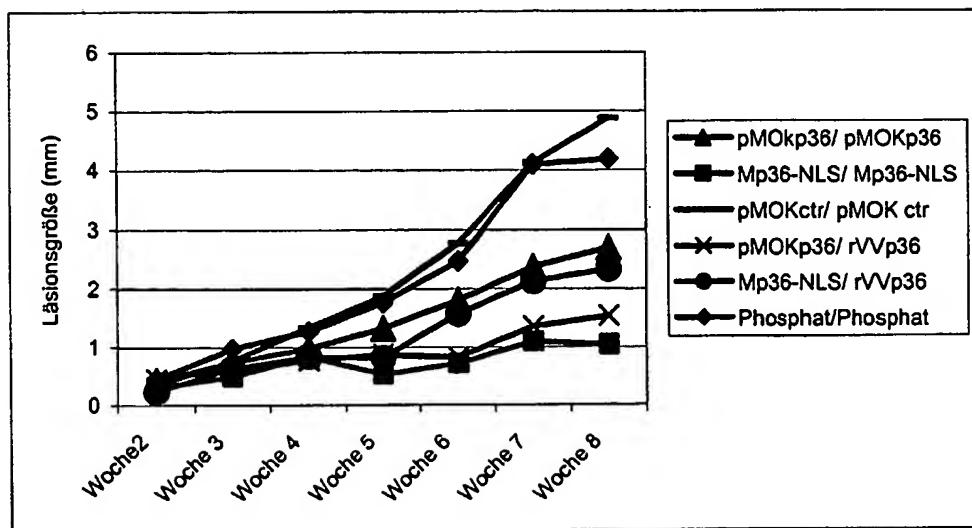
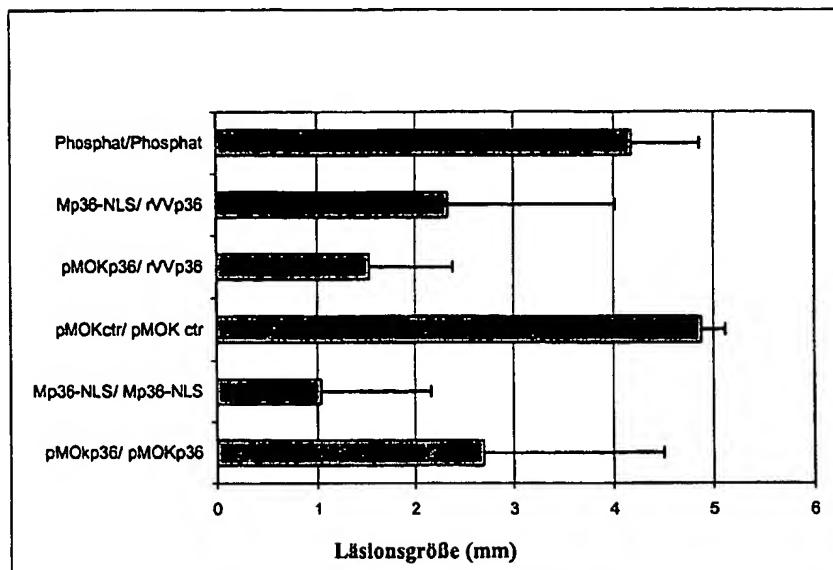
Fig. 4 Kinetik der Läsionsentwicklung

Fig. 5 Größe der Läsionen nach der Belastungsinfektion in Woche 8



Mologen-Leishmania-PCT.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH

<120> DNA-Expressionskonstrukt zur Behandlung von Infektionen mit Leishmania major

<130> XI 1396/02

<150> DE 101 48 732.0

<151> 2001-10-02

<150> DE 101 56 679.4

<151> 2001-11-12

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4791

<212> DNA

<213> Plasmid pSCP36

<220>

<221> misc_feature

<222> (1939)..(1045)

<223> Kanamycin resistance, reverse complementary

<220>

<221> promoter

<222> (2447)..(3243)

<223> CMV

<220>

Mologen-Leishmania-PCT.ST25

<221> Intron

<222> (3250)..(3386)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (3393)..(4331)

<223> p36 protein

<220>

<221> polyA_site

<222> (4338)..(4539)

<223> poly A site aus SV 40

<400> 1		
tcttcgcctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttccggctgctg gcgagcggta	60	
tca		
tcagctcact caaaaggcggt aatacggta tccacagaat cagggataa cgcaggaaag	120	
aacatgtctc gggaggccctc acgtgacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac	180	
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac	240	
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg	300	
tttccccctg gaagctccct cgtgcgtct cctgttccga ccctgccgct taccggatac	360	
ctgtccgcct ttctcccttc gggaaagcgtg ggcgtttctc atagctcacg ctgttaggtat	420	
ctcagttcgg tgttaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag	480	
cccgaccgct gcgccttatac cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggta aagacacgac	540	
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgttaggcgg	600	
gctacagagt tcttgaagtgt gtggcctaactac tacggctaca ctagaaggac agtatttttgt	660	
atctgcgtc tgcgtgaagcc agttaccccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc	720	
aaacaaacca ccgctggtag cggtggttttt tttgttgca agcagcagat tacgcgcaga	780	
aaaaaaggat ctcagaaga tcccttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC	840	
gaaaactcac gttaaaggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc	900	
cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggct	960	
gacagttacc aatgcctaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca	1020	
tccatagttg cctgactccc cgtctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat	1080	
gcgcgtcgaa tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc	1140	

Mologen-Leishmania-PCT.ST25

gccaagctct tcagcaatat cacggtagc caacgctatg tccgtatgc ggtccgccac	1200
acccagccgg ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcg	1260
caaggcaggca tcgccccatggg tcacgacgag atccctgccc tcgggcattgc tcgccttgag	1320
cctggcgaac agttcggctg gcgcgagccc ctgatgtct tcgtccagat catcctgatc	1380
gacaagaccg gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc	1440
aatgggcag gtagccggat caagcgtatg cagccgccc attgcattcag ccatgatgga	1500
tactttctcg gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgccaa	1560
tagcagccag tcccttccc cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc	1620
cgtcggtggcc agccacgata gccgcgctgc ctcgtcttgc agttcattca gggcacccgga	1680
caggtcggtc ttgacaaaaaa gaaccggcg cccctgcgt gacagccgga acacggcg	1740
atcagagcag ccgattgtct gttgtgccc gtcatagccg aatagcctct ccacccaagc	1800
ggccggagaa cctgcgtgca atccatcttgc ttcaatcata atattattga agcatttac	1860
agggttatttgc tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttgaaaaat aaacaaatag	1920
gggttcccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca	1980
tgacattaac ctataaaaat aggcttatca cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcgggt	2040
atgacggtga aaacctctga cacatgcagc tcccgagac ggtcacagct tgtctgtaa	2100
cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtttggc ggggtgtcggg	2160
gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat atgcgggtg	2220
aaataccgca cagatgcgttta aggagaaaat accgcattcag gcgcattcg ccattcaggc	2280
tgcgcaactg ttggaaaggg cgatcggtgc gggcccttgc gctattacgc cagctggcga	2340
aaggggatg tgctgcaagg cgattaagtt ggttaacgcc agggtttcc cagtcacgac	2400
gttgtaaaac gacggccagt gccaagcttg gtctccccc ggatcctcaa tattggccat	2460
tagccatatt attcatttgt tatatacgat aaatcaatat tggctattgg ccattgcata	2520
cgttgtatct atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaaata tgaccgcatt	2580
gttggcatttgc attattgact agttatataat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata	2640
gccccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggccgcct ggctgaccgc	2700
ccaaacgaccc cccgcatttgc acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	2760
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagttac	2820
atcaagtgttgc tcatatgcca agtccgccttgc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg	2880
cctggcatttgc tgcccgatgtac atgacccattac gggactttcc tacttggcag tacatctac	2940
tatttagtcat cgcttattacc atgggtatgc ggtttggca gtacaccaat gggcgtggat	3000
agcgggttgc ctcacggggta tttccaagtc tccacccat tgacgtcaat gggagttgt	3060
tttggcatttgc aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa taacccgcgc cccgttgcacgc	3120
aaatggccgg taggcgtgttgc cgggtggagg tctatataag cagaggtcgt ttgtgaacc	3180

Mologen-Leishmania-PCT.ST25

gtcagatcac tagaagcttt	attgcggtag tttatcacag	ttaaattgct aacgcagtca	3240
gtgctcgagc aggtaaagtat	caaggttaca agacaggaaa	aaggaggcca atagaaactg	3300
ggcttgcga gacagagaag	actcttcgt ttctgatagg	cacctattgg tcttactgac	3360
atccactttg ccttctctc	cacagggta ccatgaacta	cgagggtcac ctgaagggcc	3420
accgcggatg ggtcacctcc	ctggcctgcc cgcagcaggc	ggggtcgtac atcaagggtgg	3480
tgtcgacgtc gcgcgatggc	acggccatct cgtggaaagc	caaccccgac cgccacagcg	3540
tggacagcga ctacggctcg	ccgagccacc gcctcgaggg	ccacaccggc ttcgtgtcg	3600
gtgtgtcgct ggcccacgcc	accgactacg cgctgaccgc	gtcctggac cgctccatcc	3660
gcatgtggga cctgcgcaat	ggccagtgcc agcgcaagtt	cctgaagcac accaaggacg	3720
tgctcgccgt cgccctctcg	ccggacgacc gcctgatcg	gtccgcggc cgcgacaacg	3780
tgatccgcgt gtggAACGTG	gcggggcaggt gcatgcacga	gttcctgcgc gacggccacg	3840
aggactgggt gagcagcatc	tgtttctcgc cgtcgctgga	gcatccgatc gtgggtcg	3900
gcagctggga caacaccatc	aaggatgga acgtgaacgg	ggcaagtgt gagcgcacgc	3960
tcaagggccca cagcaactac	gtgtccacgg tgacgggtgc	gccagacggg tcgctgtgcg	4020
cgtccggcgg caaggacggc	gcggcgctgc tgtggacct	gagcaccggc gagcagctgt	4080
tcaagatcaa cgtggagtcg	cccatcaacc agatgcctt	ctcgccccac cgcttctgga	4140
tgtgcgtcgc gacggagagg	tccctgtccg tgtacgacct	ggagagcaag gctgtgattg	4200
cggagctgac gccggacggc	gcgaagccgt ccgagtgc	atccattgcc tggccggccg	4260
acggcaacac tctgtactcc	ggtcacaagg acaacctgat	ccgcgtgtgg tccatctccg	4320
acggccagta agagctcgat	gagtttggac aaaccacaac	tagaatgcag tgaaaaaaat	4380
gctttatTTG tggaaatttgt	gatgctattg ctttatttgt	aaccattata agctgcaata	4440
aacaagttaa caacaacaat	tgcattcatt ttatgttca	ggttcagggg gaggtgtgg	4500
aggtttttta aagcaagtaa	aacctctaca aatgtggtag	aattcagggg gagacccaaat	4560
tgcataatcat ggtcatagct	gtttcctgtg tggaaattgtt	atccgctcac aattccacac	4620
aacatacgag ccgaaagcat	aaagtgtaaa gcctgggtg	cctaattgagt gagctaactc	4680
acattaatttgcgtc	actgcccgt ttccagtcgg	gaaacctgtc gtgccagctg	4740
cattaaatgaa tcggccaaacg	cgcggggaga ggcggttgc	gtattggcgc c	4791

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1, TAT peptide

<400> 2

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

Mologen-Leishmania-PCT.ST25
1 5 10

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Simian virus 40, NLS peptide

<400> 3
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> ODN 1

<220>
<221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> xT = Thymin modified with a reactive amino group

<400> 4
gggagtccag ttttctggac 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> ODN 2

<400> 5
aggggtccag ttttctggac 20

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> 1. PCR: Primer left

<400> 6

Mologen-Leishmania-PCT.ST25
ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct

33

<210> 7
<211> 42
<212> DNA
<213> 1. PCR: Primer right

<400> 7
ttatatgagc tcagaagaca cggacaggga cctcttccgt cg 42

<210> 8
<211> 33
<212> DNA
<213> 2. PCR: Primer left

<400> 8
ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct 33

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> 2. PCR: Primer right

<400> 9
ttatatgagc tcttactcg 33